



TITLE:

<研究報告>Nocardia の抗菌性に関する研究(〔第7部〕細菌血清學部)

AUTHOR(S):

上坂, 一郎

CITATION:

上坂, 一郎. <研究報告>Nocardia の抗菌性に関する研究(〔第7部〕細菌血清學部). 京都大學結核研究所年報 1950, 1: 163-168

ISSUE DATE:

1950-03-31

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/50956>

RIGHT:

び非抗酸性形から成る事を再確認する事が出来た。唯組織中の鼠瀬菌を観察して、それを上述結核菌の所見と比較対照する時、先づ顯著に相違する点は瀬菌に於ては組織内で抗酸性形の崩壊が起り難いと云ふ点である。此事から直ぐ考へられる事は、発芽は常にそこに存在する抗酸性形を支持体としてそれに寄り添つて發育出来る訳であつて、その結果があのような多数の密な構造の集落を組織内に形成するに到るのではなからうか。

〔本研究に対して文部省科学研究費の補助を得た事を深謝する。〕

文 献

- (1) 植 田 三 郎, 日本医学及健康保険 3319号 9頁 (昭和18年)
同 3323号 5頁 (同 年)
日 本 医 学 3423号 16頁 (同 23年)
東 京 医 事 新 法 66巻 8号 10頁 (同 24年)
- (2) 隈 部 英 雄, 人体内に於ける結核菌の生態 (同 24年)
- (3) 大 岩 弘 治, 日本細菌学雑誌 (近刊) (同 25年)
- (4) Huebschmann, P., Path. Anat. d. Tuberk., (1928)
- (5) 武 内 清, 医事公論 1600号 4頁 (昭和18年)
- (6) Sabin-Doan, J. Exp. Med., 46: 645, 1927.
Sabin-Joyner, Ibid., 68: 853, 1938.
- (7) 上 坂 友 田, 日本医学及健康保険 3311号 17頁 (昭和17年)
結 核 研 究 1 巻 3号 244頁 (同 18年)
- (8) Schmitz, Frankfurt. Z. Path., 3: 88, 1909.
- (9) Rabinowitsch, L., Z. Tuberk., 15: 217, 1910,
- (10) Wegelin, Korresp. Schweiz. Aerzte, 1910, s. 913.
- (11) Opie a. Anderson, Arch. Path. a. Laborat. Med., 4: 1, 1927.
- (12) Schrader, G., Virchow's Archiv, 269: 355, 1928.
- (13) Canetti, G., Rev. d. l. Tuberc., 10: 26, 1946.

此報告の要旨は東京医事新誌66巻11号 (昭和24年) 67巻1号、同2号 (昭和25年) に発表した。

Nocardiaの抗菌性に關する研究

上 坂 一 郎

(第1報) 抗菌性 Actinomycetales の分離。

全國各地の土壤試料 143 個から改変 Czapek 寒天培地を用ひ、Actinomycetales の分離を行い、303株を分離した。土壤試料としては肥沃土を用ひる方が、瘦土を用ひるよりも明かに、分離せられる Actinomycetales の数が多く、且抗菌性を有する菌の割合も多い。分離した Actinomycetales の諸種病原細菌に対する抗菌性を改変 streak plate method にて檢し、40株の抗菌性 Actinomycetales

を得た。この40株はその抗菌スペクトルより次の3群に類別するを得た。

第1群：グラム陽性菌にのみ作用するもの。

第2群：その抗菌性が特異で、第1, 第3の両群の何れにも属しないもの。

第3群：グラム陽性陰性両群に作用するもの。

上記の類別とその培養性状との間には多少の關聯が認められる。即ち、特に Organic media 上に於て第1, 第2群は概して氣菌糸が豊富で乾燥し、白金耳を以て容易に孢子を搔取り得るに反し、第3群は概して濕潤に傾き氣菌糸少く、培地より剝離困難な場合が多い。又液体培地に於ては第1, 第2群はよく表面集落を形成するに反し、第3群は管底、或は管壁に發育し、表面に現はれない事が多い。

次に改変 Czapek 寒天上で抗菌性を示した40株の培養濾液について抗菌性を検討した。その結果、改変 Streak plate method による阻止帯の長さと同培養濾液の抗菌力とは並行しない事が認められた。

次に上記の抗菌性放線狀菌 (Actinomycetales) の分類学的検討を試みた結果、第1, 第2群には *Streptomyces cellulosae* が比較的多く、第3群には *Streptomyces roseochromogenus* が比較的多かつた。

[本報の要旨は既にペニシリン學術協議會第4回関西支部研究會、及び第22回日本細菌學會總會(昭和24年)に於て發表した。その詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。]

(第2報) 孢子形成と培地の検討。

前述の如く第3群に属する Actinomycetales は氣菌糸更に孢子の形成が微弱である。然るに菌を液体培地に植えて、培養液中に抗菌物質を多量に得んとするには孢子を植える事が必要である。茲に於て孢子を豊富に作る培地を探索する事が必要となつた。

第3群に属する16株を供試菌株とし、各種の培地についてその孢子形成を比較した処、株によつて豊富に孢子を形成する培地を異にするが、その中 Kelner & Morton が用ひた M 130 培地上で16株中6株が豊富に孢子を形成し、この点では最も優秀であつた。乍併16株中9株は何れの培地でも孢子形成が不充分であつた。

そこでこの9株中で最も抗菌力の強い A 422 号株について更に詳細に孢子形成の可能な培地の検索を行つた。

一般に孢子形成能力は栄養豊富な有機培地よりも合成培地上に於て認められ、且、含水炭素の種類により著差のある事が確認せられたので、Czapek 培地の濃度を10分の1に稀釈し、それに含有される含水炭素の種類及び濃度を種々変更して孢子形成能力を検した。その結果、Galactose (0.3%)、Glykogen (3%, 0.3%)、澱粉 (0.3%) 或は乳糖 (3%, 0.3%) を含むとその孢子形成は極めて著しく、培地全面、孢子の厚い層を以て掩はれた。經濟的には澱粉 (0.3%) 或は乳糖 (0.3%) を用ひるとよい。

(第3報) 抗菌性 *Nocardia kochi* Uesaka に就て。

上記の40株の抗菌性 Actinomycetales 中、葡萄糖ブイヨン培養液に於て最も抗菌力の強かつた A 422号株について更に詳細に検索した。

先づ分類学的所見に就て述べる。

本菌株は、檢鏡上菌糸は弱抗酸性を呈し、グラム陽性、菌糸の幅 0.8μ 、長さ $8\mu\sim 18\mu$ に及び、僅かに屈曲する。有機培地に於ては前述の如く培養の幼弱にかゝらず、菌糸の儘残存するが、乳糖加改変 Czapek 寒天上に於ては培養5,6日頃より菌糸体の一部が離脱し、更にそれがバラバラに分裂する。分裂した個々の菌体は隋円形 ($0.8\times 1.3\mu$) 或は円筒形である。菌糸より孢子が連鎖をなして生ずる事

はない。時には母菌糸体の一部がその位置に於て分裂する。

以上の孢子形成方法により本菌株は *Nocardia* に属すると認められる。

更に本菌株は特に有機培地上に於て、赤酒色或は赤褐色の色素を形成し、集落も赤褐色となるのが特長であつて、ゲラチンを液化せず、血清を溶解せず、溶血作用なく、硝酸塩を還元せず、牛乳を凝固せずして液化し、チロシナーゼを有せず、澱粉糖化力が強い。更に本菌株を馬鈴薯培地、葡萄糖寒天、葡萄糖ブイヨン、合成培地 (Waksman)、葡萄糖—アスパラギン寒天 (Krainsky)、普通寒天、合成液体培地、ゲラチン平板及び穿刺、人参培地、牛乳培地、普通ブイヨン、血液寒天 (Löffler)、卵培地、澱粉寒天培地に培養した時の集落の性狀を数日毎に観察、更に窒素源として「アスパラギン」硫酸安門、硝酸曹達、尿素、「グリココール」「L—ロイチン」亜硝酸曹達、炭素源として「ソルビット」「マンノース」蔞酸ソーダ、「アラビノース」「マンニット」「デキストリン」「クエン酸ソーダ」「キシロース」「マルトース」「イヌリン」「パラフィン」石炭酸を用ひその利用を検した。

以上の結果本菌株を新種と認め、その採取地が高知縣であるによつて *Nocardia kochi* Uesaka と命名する。

〔尙本報の詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。〕

(第4報) *Nocardia kochi* の培養濾液の抗菌性に就て。

(1) 検定用培地の検討：本抗菌物質の抗菌價は検定用培地に存する食塩により阻止せられ、食塩の濃度の増加と共に阻止の度も強くなる。又 pH の上昇によつて抗菌價は増強する。血清は大なる影響を與へない。依つて検定用培地として簡易ブイヨン (0.5% 肉エキス、0.5% ペプトン、pH 7.0) を用ひるのが適當である事を知つた。

(2) 培養瓶：目下の処では直径 1 寸の大試験管を横倒しにして培養する方法が最も確實である事を知つた。

(3) 寒天濃度の吟味：培地中に少量の寒天を入れて半凝固培地とすると發育可良となり抗菌物質の產生亦可良となる。寒天の濃度は増加する程發育及び抗菌物質產生良好であるが、抗菌力の検定、抗菌物質の抽出の場合に困難を來すから 0.2 乃至 0.3 % に加へるのが適當であつた。

(4) 培地の起始 pH：集落の發育は培地の起始 pH 6.8 乃至 7.6 に於て最も旺盛であつて、同時に抗菌力も 7.0 乃至 7.6 に於て最も強い。

(5) 継代の影響：葡萄糖寒天斜面に継代する場合には今日迄抗菌力の減退を見ないが、半凝固培地に培養すると 5,6 代乃至 7,8 代目頃より集落の發育及び抗菌力を減退する。

(6) 培養経過による抗菌力並に pH の推移：本菌株を 0.2% 寒天加葡萄糖ブイヨンに培養すると培地 pH は僅かに酸性に傾き、次で pH の急激な上昇を來す。pH の上昇にやゝ遅れて、培地内に赤褐色の色素が產生され菌集落も最初黄色であつたものが漸次、赤褐色となる。これと前後して抗菌物質は產生され始め、その最高價は培地 pH が 8 前後に達し、培地の着色が赤酒色となつてから 1 日位後に得られる (概ね培養 7~10 日目頃)。その翌日より抗菌價は急激に低下するが、培地 pH は其儘或は僅かに増加を続け、培地及び集落の着色は其儘保たれる。

(7) 各種病原菌に対する抗菌力：本抗菌物質はグラム陽性、陰性両菌共によく作用する。即ち培養液に於てブドウ球菌寺島株に対して 16 万倍稀釈でもその發育を阻止し、コレラ菌稻葉株 3200 倍、大腸菌 3200 倍、パラチフス A 菌 3200 倍、パラチフス B 菌 100 倍、チフス菌 Boxhill 株 1600 倍、チフス菌 H901 株 1600 倍、赤痢菌花房株 1600 倍、赤痢菌駒込 B₁ 株 100 倍、脾脱疽菌 1600 倍、枯草菌 100 倍である。更にブドウ球菌 8 株に対する抗菌力を檢するに寺島株の感受性は被檢菌中の中間位に位置し、特に鋭敏であるとは言はれない。次に大腸菌に対する抗菌力 (C) とブドウ球菌寺島株に対する抗菌力 (S) との

比 (C/S) は概ね 1/50 乃至それに近いが時には 1/4 の事もあり時により著しく変動する。この事實は同一菌株で 2 種以上の抗菌物質を産生する可能性を暗示して居るが尙詳細は検討中である。

(8) 本抗菌物質の作用機轉：本菌株の培養液の抗菌力を階段稀釈法で検する場合、24 時目に観察した時透明であつた試験管の相当数より菌を新しいブイヨンに継代増殖せしめ得たが、より高濃度の試験管からは証明されなかつた。この事から本抗菌物質が高濃度では殺菌的に低濃度では発育抑制的に作用する事が分る。次に 24 時間目の抗菌価よりも 48 時間、72 時間と時間の経過につれて、今迄透明であつた試験管が段々と濁濁して来る。この事は今迄発育抑制的に作用して居た抗菌物質が破壊された爲、抑制の除かれた被検菌が増殖を始めた事を示す。即ち培養液 (抗菌物質含有) をブイヨンで階段稀釈して 37°C に放置するだけで抗菌力が減弱する事から抗菌物質の破壊が起る事が立証せられたのである。

【本報の要旨は第 22 回日本細菌学会總會 (昭和 24 年) 及び日本ペニシリン学術協議會関西支部第 8 回研究會に於て発表した。その詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。】

(第 5 報) 培養液より抗菌物質の抽出。

培養液より抗菌物質を抽出するに当り先づ耐熱性、各種溶媒に対する溶解性、吸着剤への吸着等を検討した。

(1) 耐熱性：培養液の pH を 2 より 8.8 迄種々に変へて 60°C 30 分及び 1 時間、100°C 30 分及び 1 時間の 4 種の加熱方法を以て耐熱性を檢した。その結果 60°C 或は 100°C 30 分間の加熱では pH の如何に拘らず抗菌力の減弱を認めないが 60°C 1 時間或は 100°C 1 時間加熱によつて抗菌力は著しく減弱した。

(2) 溶解性：「エーテル」、「キシロール」、「ベンゼン」、「トルオール」、「アミルアルコール」、石油「エーテル」に溶解しない。

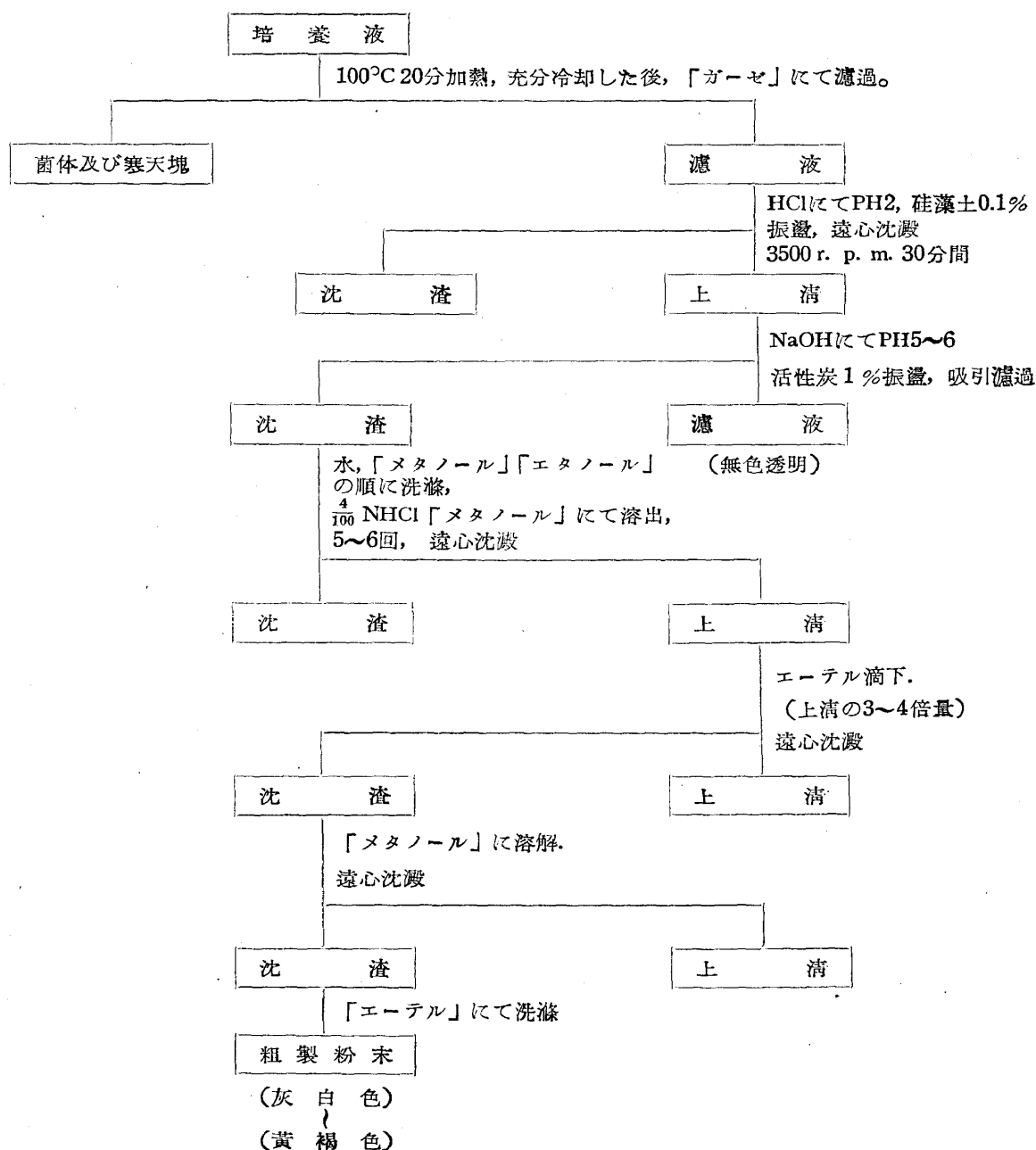
(3) 吸着剤への吸着：先づ活性炭への吸着を檢した。培養液の pH を 2.2 より 8 迄種々に変へて、活性炭 0.5% 及び 1% を加へ抗菌物質及び、培地内色素の吸着を檢した。抗菌物質は pH 5 乃至 7 に於て殆んど完全に吸着されるが、pH がそれ以上或はそれ以下になると吸着されにくくなる。培地内色素は pH の低い程よく吸着される。次に硅藻土を用いて同様の實驗を行つたが、抗菌物質の吸着は活性炭に比してやや劣るが、それでも 1% では 95% 以上吸着される。併し pH が 2 になると吸着されにくくなる。色素は酸性になる程よく吸着される。以上の實驗に於て抗菌物質は殆んど吸着されず、夾雜物及び色素のよく吸着される場合は、培養液の pH を 2 として硅藻土を 0.1% に加へた場合のみであつた。

(4) 菌体除去の影響：培養液中には寒天、菌体等を含む爲、是を除去しなければならぬ。遠心沈澱或は吸引濾過、或は單にガーゼで濾過しただけで菌体除去後の抗菌力は除去前の夫に比して $\frac{1}{2}$ 乃至 $\frac{1}{4}$ となつた。しかるに培養液を 100°C 20 分加熱してから濾過、或は遠心沈澱すると抗菌力は少しも減少しなかつた。此事は菌体に強力な抗菌力を有し、それが加熱により、溶出されたか或は加熱により抗菌物質が少し分解し却つて抗菌力が増強した事を示すものである。

(5) 活性炭よりの溶出方法：抗菌性物質を吸着した活性炭を pH 5~6 の蒸留水で洗滌しても、洗滌液中に溶出する抗菌性物質は極めて微量であつた。

次に溶出剤としては、2, 3 の溶媒について検討した結果、現在の処、 $\frac{4}{100}$ 塩酸加メタノールを用ひているが、尙この点については充分な検討を行いたいと考へている。それは略完全に溶出するに 5~6 回溶出を繰返へさなければならぬからである。

(6) 抽出方法：以上の予備實驗より、抗菌物質の溶出方法として次の如く行つた (次表参照)。



(7) 抽出物の抗菌性：抽出物は褐色乃至黄灰白色の極めて吸湿性の粉末であつて、その抗菌力はブドウ球菌寺島株 640 万倍、コレラ菌稻葉株 160 万倍、チフス菌 Boxhill 株 80 万倍、チフス菌 H901 株 80 万倍、大腸菌 80 万倍、赤痢菌花房株 80 万倍、脾脱疽菌 40 万倍、枯草菌 10 万倍であつた。又抽出物の場合も C/S (第 4 報参照) が時により著しく変動する。

(8) 抽出物の毒性：抽出物のブドウ球菌寺島株に対する抗菌力 200 万倍のものを 1000 倍に稀釈 0.5 c.c 宛マウス腹腔内に注射したが何等毒性を認めなかつた。

(9) 抽出物の作用機轉：抽出物の抗菌性の作用機轉の一端を窺ふ爲に、培養液に於ける場合と同様の方法を以て検討を行つた。その結果、抽出物を使用した場合も前者と同様に被検菌を培養後 24 時間、48 時間、72 時間と時間の経過と共に今迄透明であつた試験管が、段々と濁濁し來り、又 24 時間目に透明であつた試験管から新しいブイヨンに継代培養をすると低濃度の抗菌物質を含有していた試

験管からは継代増殖せしめ得たが、より高濃度の試験管よりは証明できなかつた。

以上により抽出物に於ても低濃度では發育抑制的に、高濃度では殺菌的に作用する事が分つた。

〔尙本報の要旨は22回日本細菌學會總會及びペニシリン學術協議會に於て発表した。詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。〕

(第6報) 抽出物の精製。

Streptomycin の精製方法に準じて本抗菌物質の精製を試みた。

先づ抽出物(粗製塩酸塩)を90%「メタノール」に溶解し、苛性曹達で pH6.3 となし、生じた沈澱と上清とを別け各々の抗菌力を測定した。その結果、兩者共、略々同等の抗菌力を有して居た。そこで上清と沈澱(90%メタノールに溶解)とを別々にクロマトグラフ法で精製した。展開には80%「メタノール」次で水を以てした。アルミナは Streptomycin の場合と同様に稀硫酸に浸漬し、水洗、乾燥後使用した。その結果、Streptomycin の場合とは反対に「メタノール」展開の分層には殆んど抗菌力を有せず、水で展開した分層に抗菌力を有して居た。然し、原液の抗菌力に比しては極めて微弱で恐らく大部分の抗菌物質は「アルミナ」に吸着されたまま残存して居るものと思考された。この抗菌力ある分層をまとめて、減圧濃縮後、メタノールを以て再結晶を行ひ、白色の結晶を得た。このものはブドウ球菌、大腸菌に対し抗菌力を有して居た。

次にアルミナは稀硫酸に浸漬する事なく、その儘詰め、抽出物は苛性曹達を用ひず、90%「メタノール」に溶解したのみで、クロマトグラフ法による精製を行つて見た。その結果、抗菌物質は殆んど完全にメタノール分層中に集められるが、この分層中には色素を含有して居た。

以上の成績に基き、目下更に精製法の改良を検討中である。

〔尙本報の詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。〕

ツベルクリン特にその製法の再検討

白 石 正 雄

緒 言

現在われわれが使用しているツベルクリン(以下「ツ」と略す)は非常に種類が多く、大部分は旧^{1) 2)}國際聯盟法に随つて標準「ツ」に力價をあわせたものであるが、實際人体について比較してみると、³⁾力價に非常な懸隔を認める。^{4) 5)} 場合用いた力價檢定法の適否如何によつて、力價の変動を招來するではあるが、特に「ツ」及びその製法の再吟味がまず問題となつてくる。即ちできる丈け精製せられた特異性の高い製品が望ましい。その代表的なものとして、すでに Maschmann und Küster のカオリン吸著法による精製「ツ」、⁶⁾ Boquet et Sandor の燐タングステン酸「ツ」があり、⁷⁾ Seibert の PPD はひろく使用されている。⁸⁾ 最近 Corper 等は Autolytic Tuberculin が「ツ」蛋白を多量に含有するといふ。^{9) 10)} 元來コッホの旧「ツ」はグリセリンブイヨンに人型菌或いは牛型菌を6~8週又は7~10週或いは菌膜が液面をおうて、大体沈下しはじめる頃まで培養し、菌体とともに濃縮して1/10量にしたものである。¹¹⁾ しかし、グリセリンブイヨンの組成成分である肉エキス、ペプトンがすでに規格のき